

内变形虫类(*Entamoeba*)的进化地位

董玖红 文建凡* 辛德东 卢思奇

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化重点实验室, 昆明 650223; 中国科学院研究生院, 北京 100039; 首都医科大学, 北京 100054. * 联系人, E-mail: wenjf@mail.kiz.ac.cn)

摘要 内变形虫类不仅因其寄生致病性而长期备受关注, 它们的进化地位也是一个十分令人注目的问题. 由于曾认为其不具线粒体等细胞器, 有人将其与其他的“不具线粒体”的原生动物统称为 archezoa, 认为它们是在线粒体产生之前即已分化的极原始真核生物, 处在原核生物向真核生物的过渡阶段. 然而, 近年来的研究表明, 内变形虫类是具有线粒体等细胞器的, 其线粒体可能特化成了后来才发现的 crypton 或 mitosome. 近来的分子系统研究也表明, 它们应该是具有(或曾经具有)线粒体的. 我们的 DNA 拓扑异构酶 分子系统分析明显显示它们的分化应该是在很多具线粒体的生物分化之后. 本文就这些研究情况进行了较全面的概述, 并对其进化地位进行了进一步分析探讨.

关键词 内变形虫 线粒体 mitosome 分子系统 进化地位

内变形虫类(*Entamoeba*)是变形虫中的一个类群. 由于它们中有些为危害较大的寄生原虫, 如痢疾内变形虫(*Entamoeba histolytica*)寄生于人和其他灵长类的肠道, 引起阿米巴痢疾等疾病, 因而在医学上一直备受关注. 在传统分类上, 一般将该类生物置于原生动物门、肉足纲、变形目中, 作为一个属. 但是前些年, 曾因发现它们具有一系列“原始特征”, 如“不具线粒体等细胞器”和一些分子系统学研究结果, 而认为它们可能是一类极为原始的生物类群, 在真核生物中处在极为原始的进化地位. 并将其从一般的变形虫类中独立出来与其他几类也被认为是“不具线粒体”的原生动物(Metamonada, 如贾第虫; Microsporidia, 如微孢子虫; Parabasalia, 如毛滴虫)一起统称为 Archezoa(源真核生物), 成为真核生物中的一个界^[1]. 不少学者认为, 它们可能是处在原核细胞向真核细胞进化的过渡环节, 对于探讨真核细胞的起源进化具有十分重要的意义. 因此内变形虫类的进化地位一度引起人们的高度关注, 这类生物也就成了近些年来进化生物学, 尤其是在“真核细胞起源进化”方面研究的热门生物类群之一.

然而随着研究的深入, 近些年来不断积累的证据表明, 这类生物可能不像原来所认为的那么原始, 其进化地位需要重新考虑. 本文就近年来国际上有关这方面的研究情况进行了较为全面的概述, 并结合本实验室有关 DNA 拓扑异构酶 分子系统学方面的研究结果, 对这一问题进行了进一步探讨.

1 细胞结构方面的研究证据

早期的细胞形态结构研究发现内变形虫类除了具有典型的细胞核以外, 细胞质内不具线粒体、过氧化物酶体、内质网和高尔基体等真核生物所普遍具有的细胞器. 这种细胞质中没有细胞器的情形类似于原核生物, 因而被认为是内变形虫类的极端原始性的重要细胞学证据. 但是, 近年来人们先是在该类生物的核基因组中发现了线粒体来源的基因, 接着又发现了类似线粒体的细胞器 crypton 或 mitosome, 后来又观察到了分泌泡(secretory vesicles)、内质网(endoplasmic reticulum)和高尔基体(Golgi apparatus)等细胞器结构. 因此这些曾被认为是原始性的细胞学证据就基本被逐一否定了. 具体情况如下:

1.1 线粒体类似结构(crypton 或 mitosome)的发现

线粒体的“内共生起源学说”现已被普遍接受. 根据这一学说, 线粒体是由细菌在真核细胞内共生而逐渐起源形成的. 在这一共生起源过程中, 内共生体(即细菌)的大部分基因转移到了细胞核的基因组中, 这些基因所编码的蛋白质在细胞质中合成, 成熟后再输入到线粒体中行使功能. 按理, 既然内变形虫类“不具线粒体”(甚至它们被认为是在线粒体形成之前就已分化出来的极原始的真核细胞), 那么它的核基因组中就不应该有这样的由线粒体祖先转移而来的基因. 然而, 出人意料的是, 近年来在多种内变形虫(包括 *E. histolytica*, *E. invadens*, *E. moshkovskii*, *E. terrapinae* 和 *E. dispar*)的核基因组中却都至少发现了

3种这样的基因,即嘧啶核苷酸转氢酶(*pnt*),分子伴侣60(*cpn60*)和线粒体的热休克蛋白70(*mt-hsp70*)^[2-4]。进一步的分子系统学研究表明,除PNT所得的分子系统树因大部分分枝支持率很低而难以得出肯定的结论外,CPN60和mt-HSP70的分子系统树都很明确地显示,内变形虫的这些蛋白与其他真核生物线粒体的相应蛋白质聚在一起,是同源的^[2-5]。并且,分子系统学分析还显示,这些线粒体起源的基因并不是最近由其他生物水平基因转移到内变形虫中的,而是在内变形虫的祖先中就已存在^[4]。这些事实说明内变形虫的这些基因与其他真核生物的一样应该是在很早时期就由线粒体的祖先转移到了核基因组中。另外,用热激的方法成功诱导了内变形虫上述3个基因的表达,这说明这些基因编码的蛋白质是有功能的^[4]。

上述线粒体来源基因的发现至少使人们有理由相信内变形虫类曾经有过线粒体或内共生过线粒体的祖先,现在“不具线粒体”现象只能是在进化过程中的次生性丢失(secondary loss)。然而,更让人意外的是,有2个研究小组在研究CPN60在痢疾内变形虫细胞中的定位时,发现内变形虫类实际上是具有类似线粒体的细胞器的,并分别命名为crypton(因其以前隐含,后来才发现且功能未知,故得名)^[6]和mitosome(该名称表明其为线粒体起源的)^[7]。该细胞器呈圆柱形,每个细胞中有1~2个,定位在其中的CPN60分子具有与其线粒体或产氢体的同源物一样的细胞器定位信号。去掉此定位信号,CPN60就散布在胞质中而不能定位到该细胞器中去;若加上动基体(即动基体类原生动物的特化线粒体)HSP70的定位信号,则又能定位到该细胞器中去^[7]。这些实验结果说明,该细胞器具有线粒体一些相似的性质,应该是一种类似线粒体的结构或特化的线粒体。人们还进一步从线粒体的某些独有特征上考察了该细胞器,结果表明,()它没有产生ATP的功能^[6],()起初认为它不具有基因组^[6],后来又证明它含有双链DNA^[8],()具有双层膜结构^[8]。

因此,应该说内变形虫类不是“不具线粒体”,而是具有一种与线粒体相类似的细胞器。虽然该细胞器不能进行有氧分解产生ATP,但上述一系列特征足以说明它与线粒体是同源的。内变形虫类主要是通过糖酵解的方式产生ATP的,那些参与糖酵解途径的蛋白质如铁氧还蛋白已被证明是定位在胞质中的^[6]。

这应该是与它们主要生活在厌氧环境相适应的。因此,作为内变形虫类原始性的重要证据之一的“不具线粒体”看来已难以成立。

1.2 分泌泡、内质网和高尔基体的发现

除线粒体外,内膜系统也是真核生物区别于原核生物的特征之一。早期对内变形虫的电子显微镜观察未能发现它具有内质网、高尔基体和分泌泡等这些内膜系统。然而随着实验技术的改进,后来人们发现它们也是具有这些内膜系统的。例如,早在1997年就有人用电子显微镜细胞化学和荧光激光共聚焦显微技术在*E. moshkovskii*和*E. histolytic*胞质中观察到了一些与内质网和高尔基体有关的囊泡^[9]。这些实验虽然没能清晰的显示出内膜系统的结构,但已初步表明了内变形虫应该是有内质网和高尔基体的。后来,Ghosh等人^[10]进一步利用这些内膜系统上的标志性分子(如分泌泡上的几丁质酶和Ariel抗原,内质网中的ERD2受体以及高尔基体上的ADP-核糖基化作用因子和 ϵ -COP等)的定位,通过激光共聚焦显微技术证实了内变形虫中分泌泡、内质网和高尔基体的存在,但在该实验中观察到的内质网和高尔基体分别呈泡状和核周荧光片层^[10],与典型的内质网和高尔基体结构差别很大。这可能是因为用多聚甲醛固定的细胞结构未能保持其自然形态,还可能与激光共聚焦显微镜的分辨率较电子显微镜低得多有关。果然,随后Chavez-Munguia等人^[11]通过改进传统的电子显微镜技术,采用冷固定(cryofixation)和冷替代(cryosubstitution)方法在*E. dispar*和*E. histolytica*中清楚的观察到了更为接近于真实状态的光面内质网和高尔基体:直径大约50nm的光面内质网散布在胞质中;中心区域直径大约有15nm的高尔基体同样分散在胞质中,能够达到4个一组(典型真核细胞的是7个一组),在两端可见到一些小泡,可能是高尔基体囊泡结构。

从这些研究结果可知,内变形虫的细胞内不仅具有内膜系统,而且是比较完善的。

从以上研究结果我们不难发现,内变形虫的细胞结构并不是人们最初认为的那么简单或原始,过去认为它们不具有线粒体和内膜系统等现象,应该是由于它们的结构比较特别或研究技术等方面的原因而未发现所致。至此,在细胞结构方面认为这类生物极端原始性的证据都已基本被否定。

2 分子系统学方面的研究证据

2.1 早期的分子系统学研究

虽然早期的rRNA分子系统树并没有将内变形虫类置于极原始的真核生物的位置,如核糖体小亚基rRNA分子系统树^[12],但是不少基于蛋白质序列,如延伸因子EF-1 α , EF2 以及微管蛋白分子序列进行的系统分析却把内变形虫类置于真核生物系统演化树的较早分支^[13-15]. 后者对内变形虫类属于最原始真核生物类——源真核生物的观点也起了支持作用. 因此在这些早期的分子系统学研究中,内变形虫类的进化地位较为混乱,难以确定.

造成这种状况的原因可能主要是因为分子系统分析方法受到分子进化速率、(G+C)含量、covarion结构以及序列比对的模糊性等等的影响^[16]. 由于上述因素的影响,会产生人为的分枝错位(artifactual grouping),最常见的就是“长枝吸引(long branch attraction)”,即将有相似序列特征,而并非近缘的物种聚在一起^[16]. 有人认为,源真核生物在真核生物系统发育树中分枝最早、最接近原核生物的现象很可能就是由于这种“长枝吸引”所引起的假象,即由于它们的序列较一般真核生物的变异较大,因而与分子序列同样与一般真核生物差别很大的外群(即原核生物)靠得很近^[17].

2.2 近来的分子系统学研究

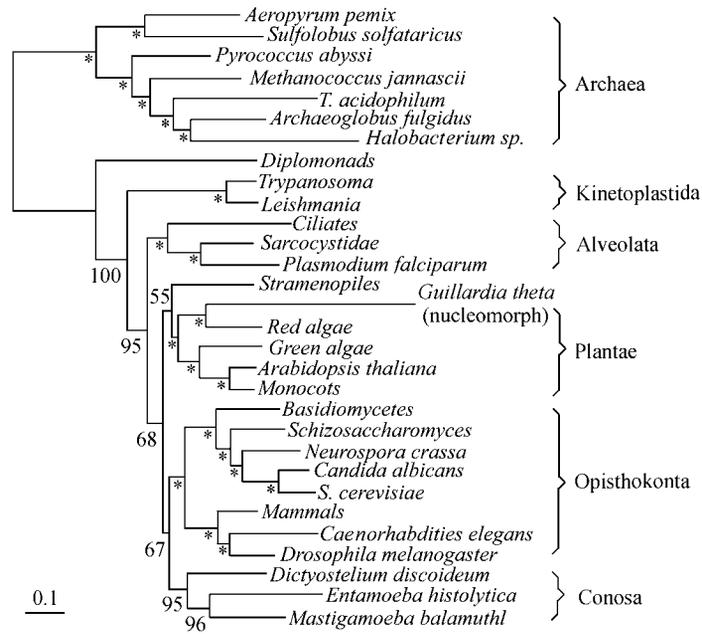
随着分子数据的不断增多和分子系统学研究方法的不断完善,近些年来有关内变形虫类的分子系统学研究取得了一些重要的新进展.

() 内变形虫中参与糖酵解的酶系是由细菌通过基因水平转移(lateral gene transfer)而来的. 多个研究组的分子系统树研究显示,内变形虫的很多参与糖酵解途径的酶是与不同的厌氧细菌的相应酶紧密聚在一起的,这表明内变形虫的这些酶的基因是通过水平基因转移从这些厌氧细菌获得的. 这些酶包括丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(pyruvate: ferredoxin oxidoreductase)、铁氧还蛋白、乙醇脱氢酶、乙酰辅酶A合成酶、硝化还原酶、NADH氧化酶和铁氢酶等等^[18-21]. 这说明内变形虫中参与糖酵解的酶系不是从其祖先继承下来的或来源于内共生起源的线粒体. 因此,也就否定了过去作为内变形虫极原始性的一个证据,即其糖酵解的酶系与原核生物的一致. 现在看来,这种酶系的一致性是由于基因水平转移的结果,并非反映这类生物与原核生物相近而极为原

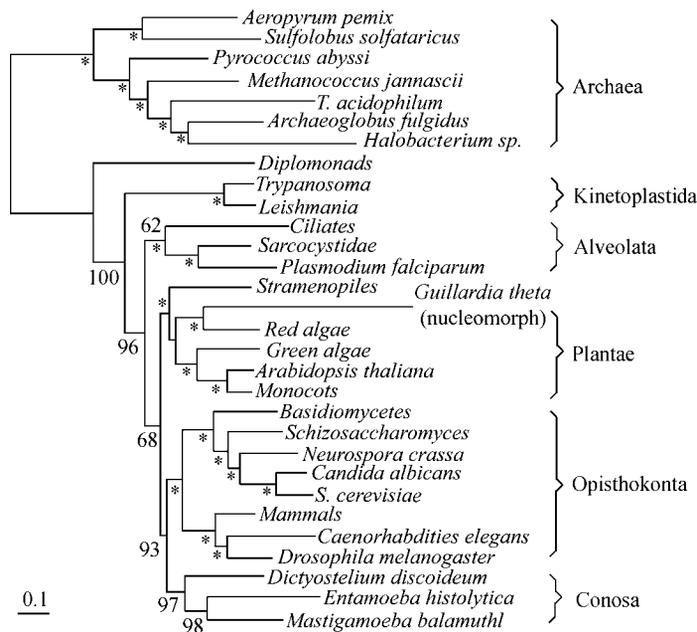
始.

() 内变形虫的营自由生活的近缘类群是鞭毛阿米巴(Mastigamoeba),而二者的共同近缘类群却是具有线粒体的黏菌虫(Dictyostelium). 如前所述,曾有人将包括内变形虫在内的几类“不具线粒体”的原生动物统称为一类最原始的真核生物——archezoza(源真核生物). 这一观点一经提出,就有人提出质疑,认为当时所包括的这些生物都是些寄生原虫,它们“不具线粒体”的现象很可能是由于寄生生活导致的次生性丢失所致,因此有必要鉴定出与它们关系密切的营自由生活的近缘种类,看看后者是否也是不具有线粒体的. 然而内变形虫类营自由生活的近缘种类是什么,多年来一直悬而未决. Cavalier-Smith^[22]曾认为,虽然内变形虫、阿米巴鞭毛虫(Mastigamoeba)以及黏菌虫(Dictyostelium)3种生物的细胞形态很是不同,但它们的亲缘关系应该还是很近的,并把它们一起归于一个新的亚门,称为Conosa. 为了验证这一看法, Baptiste等人^[23]利用30个物种123个基因的大约25000个氨基酸位点用最大似然法重构系统发育树,并采用 Γ law计算了位点突变速率,以缓和“长枝吸引”的影响. 所得的分子系统树显示,内变形虫和鞭毛阿米巴聚在一起,形成姐妹枝,而后再与黏菌虫聚在一起,即后者是前二者的最近外群(图1). 这表明内变形虫与鞭毛阿米巴的亲缘关系最近,然后它们共同又与黏菌虫有着最近的亲缘关系,具有共同的祖先. 这一结果显然支持了上述的Conosa假说. 更重要的是,由于3种生物中黏菌虫是具有线粒体营自由生活的,鞭毛阿米巴和内变形虫都没有线粒体,但前者自由生活,后者寄生生活,因此根据该分子系统树的结果还可得出这样的推论:黏菌虫、鞭毛阿米巴和内变形虫三者的共同祖先应该是具有线粒体的,后二者中虽然都没有线粒体,但一个营自由生活,另一个营寄生生活,这说明“无线粒体”的现象不应该是因寄生生活而退化的结果. 相反,很可能是线粒体退化以后导致的内变形虫的寄生^[23]. 这一推论实际上得到了后来在内变形虫中发现了“与线粒体同源的细胞器”这一事实的支持,亦即后来发现的crypton或mitosome很可能就是由线粒体退化或特化而形成的.

因此,从以上可知内变形虫类“不具线粒体”的现象虽然不像这是由于寄生生活所致,但这一现象仍然不能成为这类生物的极为原始性的证据. 更何况后来发现它们具有线粒体同源的细胞器(crypton 或 mitosome).



(a)



(b)

图 1 基于 123 个基因的大约 25032 个氨基酸位点构建的最大似然树

(a) 采用 JTT 氨基酸替代模型, 未考虑位点间进化速率的不同; (b) 考虑了位点间进化速率的不同 (JTT + Γ model) [23]

() 本实验室 DNA 拓扑异构酶 的分子系统研究. 基于多基因序列的系统分析, 虽然似乎较单基因树更可靠, 但仍存在很多问题 [24]. 况且, 多基因树也

是基于很多个单个基因构建的, 各种各样的基因树需要综合起来分析以得到一致树, 要得到一致树, 首先要做的还是寻找合适的分子标记.

DNA 拓扑异构酶 (DNA Topoisomerase, 简称 Topo) 是真核生物细胞核内普遍存在的一种酶, 主要功能是调节 DNA 的拓扑结构, 从而保证 DNA 复制、转录、重组以及染色体凝集、分离等功能活动的正常进行。由于这种酶具有以下特点: (1) 它们在所有真核生物中都存在, 在原核生物中也有其同源物 (DNA 旋转酶 gyrase 和 DNA 拓扑异构酶), 后者可以用来作为前者分子系统研究的外群; (2) 蛋白质序列非常保守, 有很多保守基序 (motif); (3) 分子进化速率相对适中; (4) 这类蛋白质参与的是核内 DNA 的代谢过程, 因而应该与营养方式 (即无论是寄生生活还是自由生活) 没有直接的关系, 这就不会产生有人担心的“由于寄生生活而发生较大的变异”而导致前述的“长枝吸引”等。因此我们认为它是一个理想的分子标记, 很适合用来分析真核生物大类群之间的系统发育关系。

目前已经报导了包括很多高等真核生物 (如人、鼠、果蝇、线虫、酵母等) 的以及部分原生动物 (如锥虫类、利什曼原虫、疟原虫等) 的 DNA Topo 基因及蛋白序列。我们实验室最近分别在 archezoa 中的蓝氏贾第虫 (*G. lamblia*) 基因组和痢疾内变形虫 (*E. histolytica*) 的基因组中获得了它们的 DNA Topo 基因的完整序列 (GenBank 登录号分别为: AY278365; AY504965)。因此具备了利用 Topo 为分子标记进行内变形虫在真核生物中的系统地位分析的条件。我们选择较少受“长枝吸引”影响的距离法^[17], 以与真核生物 Topo 同源的真细菌的 DNA 旋转酶 (gyrase) 为外群, 构建了包括真核生物主要类群的 Topo 分子系统树 (图 2), 采用 Phylip 系统分析软件包中的 Fitch 法, 进行序列重排 (global rearrangement) 和 10 次重复估算, 选择 JTT 氨基酸替代模型, 位点突变速率差异通过包括 1 个不变位点和 8 个 gamma 的 γ 分布模型, 用 treepuzzle 软件估算, 各分枝的置信水平由 1000 自展法重复估算, 最后通过 Consense 软件获得多数一致树。该分子系统树所显示的系统关系整体上符合被广泛接受的“五界系统说”。但其中的原生物类较为复杂, 它们不像其他几大类群一样各自聚成一大枝, 而是较为分散, 这反映了原生物的庞杂和多样性。甚至其中的顶复门类与动物聚为一大枝, 但考虑到其支持率较低。而且用 treepuzzle 软件进行 χ^2 检验 (5% chi-square test) 时显示, 顶复门生物的 Topo 序列氨基酸组成与其他生物的差别很大, 与分析出来的“一

致序列”的差异大于 5%, 通不过该检验, 因此本系统树中显示的顶复门类的位置可信度较低, 而其他类群的位置均有较高的可信度。最重要的是: 本系统树中, 内变形虫并不像以前有的分子系统树所显示的那样处在真核生物的基部, 也不与原来同样认为是“不具线粒体”同为 archezoa (源真核生物) 的贾第虫 (*G. lamblia*) 聚在一起, 而是出现在一些具线粒体的生物如动基体类和黏菌虫类等的分化之后, 较它们更加接近于高等真核生物。考虑到 Topo 的上述优点, 我们认为它的这一进化地位较之以前有些系统树所显示的“分支很早、处在极原始进化地位”的结果更为可靠。因此, 我们的这一结果表明, 内变形虫类的进化地位不应是以前所认为的那么原始, 更不可能是处在线粒体产生之前的原始真核生物的“子遗”, 而是在很多具线粒体的单细胞生物分化之后才分化出来的。

从以上可知, 由于研究方法的完善和数据的增多, 分子系统学的研究结果较以前的研究应该更准确地揭示了内变形虫类的进化地位并不位于真核生物的基部, 它甚至是在很多具有线粒体的真核生物分化之后才分化的。因此, 至少是其祖先应该是具有线粒体的, 或它现在应该仍然具有线粒体的类似细胞器 (这与上述的近来发现了类似线粒体的细胞器是一致的)。

3 启示与展望

从上面有关内变形虫进化地位的研究情况可知, 原来认为该类生物处在真核生物中的极端原始进化地位的两方面的主要证据都已基本被否定。一方面是线粒体和内膜系统等的发现对原来认为的这类生物细胞结构简单、不具线粒体等细胞器和内膜系统等的否定; 另一方面是新近的分子系统学研究否定了原来认为其处在真核生物基部的研究结果。但值得注意的是, 虽然有一定的证据认为在内变形虫中后来找到的细胞器 (crypton 或 mitosome) 是线粒体的同源细胞器, 但该细胞器究竟与典型线粒体有着怎样的关系还有待进一步探讨。因为还不能确定这种细胞器究竟是由典型线粒体特化或退化而来的, 还是与典型线粒体平行进化而来的。但是, 无论如何, 通过近几十年来的研究人们对该类生物进化地位的认识已经向前迈进了一大步, 从早期的认为处在真核生物中的极原始地位转变到了现在的认为其并非如此原始, 而是在一些具线粒体的原生物分化之后才

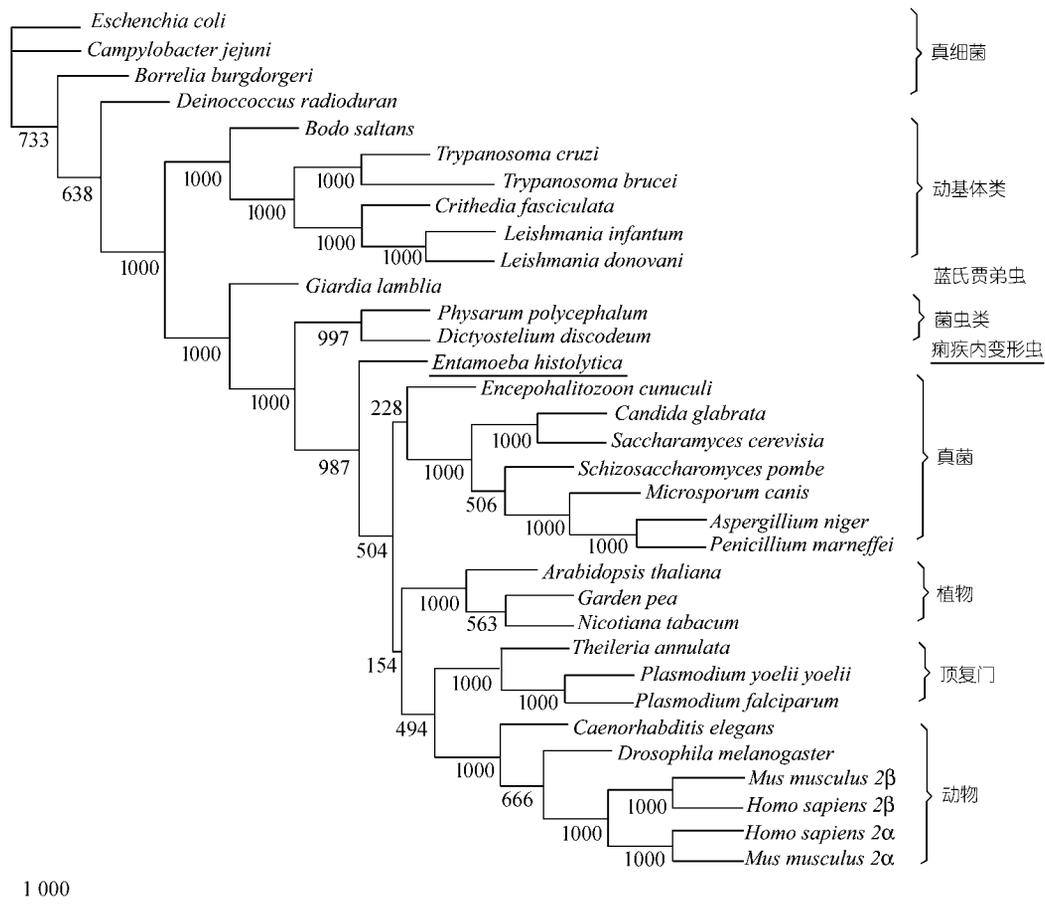


图 2 根据各物种 Topo 氨基酸序列用 fitch 法构建的距离树(JTT + γ 分布模型)

各节点处的数值是由 1000 次自展法计算得出的置信水平, 各分枝的枝长根据标尺按比例显示. 所用 Topo 序列的 GenBank 登录号如下: *Escherichia coli*, GyrB NP_312661, GyrA NP_311141; *Campylobacter jejuni*, GyrB NP_281225, GyrA NP_282177; *Borrelia burgdorferi*, GyrB AAC66802, GyrA AAC66803; *Deinococcus radiodurans*, GyrB NP_294630, GyrA NP_295636; *Bodo saltans*, AAL99217; *Trypanosoma cruzi*, A48446; *Trypanosoma brucei*, P12531; *Crithidia fasciculata*, A45648; *Leishmania infantum*, AAF86355; *Leishmania donovani*, O61078; *Giardia lamblia*, AAP33503; *Physarum polycephalum*, AAP83584; *Dictyostelium discoideum*, T30577; *Entamoeba histolytica*, AAR91745; *Encephalitozoon cuniculi*, NP_584718; *Candia glabrata*, O93794; *Schizosaccharomyces pombe*, P08096; *Microsporium canis*, BAC24013; *Aspergillus niger*, BAB84102; *Penicillium marneffeii*, BAB84105; *Arabidopsis thaliana*, S53599; *Garden pea*, T06819; *Nicotiana tabacum*, AAN85207; *Theileria annulata*, gnl|Sanger_5874|Contig1533; *Plasmodium yoelii yoelii*, EAA22961; *Plasmodium falciparum*, NP_702205; *Caenorhabditis elegans*, NP_496536; *Drosophila melanogaster*, P15348; *Mus musculus* 2 β , NP_033435; *Homo sapiens* 2 β , NP_001059; *Homo sapiens* 2 σ , NP_001058; *Mus musculus* 2 σ , NP_035753

分化的. 这一转变过程至少给了我们这样的启示:

() 由于低等单细胞生物与高等生物的典型真核细胞之间存在一些差异, 造成人们往往在将高等生物上首先认识的结构往低等生物上“套”的时候会出现一些偏差, 或在高等生物上首先使用并证明行之有效的研究方法在搬到低等生物上来的时候往往出现不适用或得到不正确的结果, 这在以低等生物为研究对象的进化生物学研究中值得注意.

() 低等生物上的一些不同于高等生物上的特征究竟是原始的特征还是次生的特征或者说是由于生活在特定环境而特化或退化的特征, 这是一个经

常困扰进化生物学研究的问题. 怎样甄别这样的特征有时就成为影响研究结果正确与否的关键, 这也是进化生物学研究中需要引起高度重视的问题.

() 在分子系统学研究方面, 存在选用什么样的分子或分子的什么特征作为标记来分析跨度很大的进化关系才较适合的问题. 之所以造成内变形虫在早期分子进化树中位置的混乱, 除早期的分析方法不够完善如未考虑长枝吸引等因素外, 一个重要的原因是与所选择的分子和特征是否能合适反映这种远距离进化关系有关.

新近出现了一种利用“次生的基因融合(derived

gene fusion)"现象作为标记进行系统学分析的方法来寻找真核生物系统演化的根,并探讨所有生物类群之间的关系.例如,dihydrofolate reductase(DHFR)和thymidylate synthase(TS)有次生的基因融合现象,在细菌中二者的基因在同一个可读框中,分开翻译;在动物和真菌中,二者有各自的可读框,分别翻译成DHFR和TS;在植物、顶复门和眼虫类中,却存在双功能的融合基因,所翻译的蛋白质兼具DHFR和TS的活性.利用这2个基因的融合与否所反映的生物类群的系统关系,的确揭示出了一些前所未有的系统发生关系^[25].但在痢疾内变形虫基因组数据库(尚未完全完成)中既没有找到单个的DHFR或TS基因也未找到二者的融合基因^[25],因此也就无法用该方法探讨内变形虫类的进化地位.

总之,近几十年来的研究,在不断澄清和确定内变形虫类的进化地位方面取得了重要进展,但要揭示该类生物的更为准确的进化地位与系统发育关系还有待于新的研究的突破.

致谢 本工作为中国科学院知识创新工程重要方向(批准号:KSCX2-SW-101C)、国家自然科学基金(批准号:30021004,30170135)、云南省中青年学术带头人培养经费(批准号:2000YP19)的资助项目.

参 考 文 献

- Cavalier-Smith T. A six-kingdom classification and a unified phylogeny. In: Schenk H E A, Schwemmler W S, eds. *Endocytobiology*. Berlin: Walter de Gruyter, 1983. 1027~1034
- Clark C G, Roger A J. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(14): 6518~6521
- Bakatselou C, Kidgell C, Graham Clark C. A mitochondrial-type hsp70 gene of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 110(1): 177~182[DOI]
- Bakatselou C, Beste D, Kadri A O, et al. Analysis of genes of mitochondria origin in the genus *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*, 2003, 50(3): 210~214
- Arisue N, Sanchez L B, Weiss L M, et al. Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol Int*, 2002, 51(1): 9~16[DOI]
- Mai Z, Ghosh S, Frisardi M, et al. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(3): 2198~2205
- Tovar J, Fischer A, Clark C G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*, 1999, 32(5): 1013~1021[DOI]
- Ghosh S K, Field J, Rogers R, et al. The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane. *Infect Immun*, 2000, 68(7): 4319~4322[DOI]
- Mazzucco A, Benchimol M, de Souza W. Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron*, 1997, 28(3): 241~247[DOI]
- Ghosh SK, Field J, Frisardi M, et al. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: Localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun*, 1999, 67(6): 3073~3081
- Chavez-Munguia B, Espinosa-Cantellano M, Castanon G, et al. Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res*, 2000, 31(4 Suppl): S165~S167[DOI]
- Sogin M L. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, 1991, 1(4): 457~463
- Hasegawa M, Hashimoto T, Adachi J, et al. Early branchings in the evolution of eukaryotes: Ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J Mol Evol*, 1993, 36(4): 380~388
- Shirakura T, Hashimoto T, Nakamura Y, et al. Phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, *Entamoeba histolytica*, inferred from amino acid sequences of elongation factor 2'. *Jpn J Genet*, 1994, 69(2): 119~135
- Edlind T D, Li J, Visvesvara G S, et al. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogeny Evol*, 1996, 5(2): 359~367[DOI]
- Philippe H, Germot A. Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: Long-branch attraction and models of sequence evolution. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(5): 830~834
- Philippe H. Opinion: long branch attraction and protist phylogeny. *Protist*, 2000, 151(4): 307~316
- Rosenthal B, Mai Z, Caplivski D, et al. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Bacteriol*, 1997, 179(11): 3736~3745
- Field J, Rosenthal B, Samuelson J. Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*, 2000, 38(3): 446~455[DOI]
- Nixon J E, Wang A, Field J, et al. Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell*, 2002, 1(2): 181~190[DOI]
- Nixon J E, Field J, McArthur A G, et al. Iron-dependent hydroxylases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Activity of the recombinant entamoebic enzyme and evidence for lateral gene transfer. *Biol Bull*, 2003, 204(1): 1~9
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev*, 1998, 73: 203~266[DOI]
- Baptiste E, Brinkmann H, Lee J A, et al. The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba*, and *Mastigamoeba*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1414~1419[DOI]
- Baldauf S L, Roger A J, Wenk-Siefert I, et al. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 2002, 290: 972~977[DOI]
- Stechmann A, Cavalier-Smith T. Rooting the eukaryote tree by using a derived gene fusion. *Science*, 2002, 297(5578): 89~91[DOI]

(2004-03-09 收稿, 2004-07-05 收修改稿)